

⑥日本国特許庁 (JP) ⑦特許出願公開  
⑧公開特許公報 (A) 昭63-39576

⑨Int.Cl.  
C 12 N 1/16  
15/00

識別記号 廣内整理番号  
K-6712-4B  
7115-4B

⑩公開 昭和63年(1988)2月20日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全10頁)

⑪発明の名称 酵母の遺伝子修飾方法

⑫特 願 昭62-158504

⑬出 願 昭62(1987)6月26日

⑭優先権主張 ⑮1985年6月27日イギリス(GB)⑯8615701

⑯發明者 エドワード・ヒンクリー・ラム  
ツフェ イギリス國 ノッティンガム、バートン・ジョイス、ラム  
ブリイ・レーン, 16

⑯發明者 クリストイン・ジャー・フレミング イギリス國 エルハイム、7ジーダー・ライセスタシヤー, ウエスト・ハンバーストーン, ハンティンドン・ロード, 41

⑯出願人 デルタ・バイオテクノロジー・リミテッド イギリス國 ディーイー14-1ジェイゼット・バートン  
オン・トレント・ハイ・ストリート, 137

⑯代理人 弁理士 浅村 鮎 外2名

明細書の抄書(内容に変更なし)

明細書

1. 発明の名称

酵母の遺伝子修飾方法

2. 特許請求の範囲

1) 相同な 2  $\mu$ m プラスミド DNA 配列の 2 コピーが相互に直列方向に連結し、目的の蛋白質またはペプチドをコードする DNA 配列を含む組込みベクターで酵母を先ず形質転換し、次に得られる形質転換酵母から該 DNA 配列を組みこんでいるが該ベクターは含有しない内因性 2  $\mu$ m プラスミドを保有する細胞を単離することより成る、目的蛋白質またはペプチドをコードする DNA を内因性 2  $\mu$ m プラスミドに取り込むことによる酵母の遺伝的修飾方法。

2) 組込みベクターが、目的の蛋白質またはペプチドをコードする DNA 配列から直列方向の該相同配列により隔てられる DNA 配列をも含有する特許請求の範囲第1)項記載の方法。

3) 該外因 DNA 配列がベクタリア中でのベクターの増殖を助け、酵母に対して異種の DNA 配列であ

る特許請求の範囲第2)項記載の方法。

4) 該ベクターが目的の蛋白質またはペプチドをコードする DNA 配列から直列方向の相同配列により隔てられることのない選択マークー DNA 配列をも含有する特許請求の範囲第3)項記載の方法。

5) 選択マークー DNA 配列が酵母に対する耐性をコードする遺伝子である特許請求の範囲第4)項記載の方法。

6) 該ベクターが酵母の 2  $\mu$ m プラスミド固有の複製開始点を含有する特許請求の範囲第5)項記載の方法。

7) 目的の蛋白質またはペプチドをコードする DNA 配列がヒト血清アルブミンまたはその誘導体をコードする特許請求の範囲第6)項記載の方法。

8) 直列方向の相同な 2  $\mu$ m プラスミド配列の夫夫が酵母の内因性 2  $\mu$ m プラスミドからの DNA の EcoRI 部位および XbaI 部位で選まれる 705 塩基対より成る特許請求の範囲第7)項記載の方法。

9) 酵母が酵素酵母である特許請求の範囲第8)項記載の方法。

10) 相同な 2  $\mu$ m プラスミド配列が直列方向に 2 コピー、酵母以外でのプラスミド増殖を助ける DNA 配列およびプラスミド増殖を助ける該 DNA 配列から直列方向の該相同配列により隔離される目的の異種蛋白質またはペプチドをコードする DNA 配列を含有する 2  $\mu$ m プラスミドベクター。

11) 目的の蛋白質またはペプチドをコードする DNA 配列から直列方向の相同配列により隔離されない選択マーカー DNA をも含有する特許請求の範囲第10)項記載の 2  $\mu$ m プラスミドベクター。

12) 選択マーカー DNA 配列が酵に対する耐性をコードする遺伝子である特許請求の範囲第11)項記載の 2  $\mu$ m プラスミドベクター。

13) 酵母の 2  $\mu$ m プラスミド固有の複製開始点を含有する特許請求の範囲第10)項記載の 2  $\mu$ m プラスミドベクター。

14) 目的の異種蛋白質またはペプチドがヒト血清アルブミンまたはその誘導体である特許請求の範囲第10)項記載の 2  $\mu$ m プラスミドベクター。

15) 直列方向の相同な 2  $\mu$ m プラスミド配列の夫

(a) DNA 複製の開始点が酵母固有の 2  $\mu$ m プラスミドに由来する 2  $\mu$ m プラスミドベクター。

(b) 「見かけ」の複製開始点が酵母の染色体 DNA に由来する自律複製ベクター (ARS)、および

(c) 上記 DNA 複製開始点の一つに加え、動原体を保有することが知られている酵母染色体 DNA の配列を含有する動原体プラスミド (CEN) である。

上記ベクターのいずれかで酵母を効率よく形質転換するためには、組換え DNA を保有する形質転換用を同定する選択マーカーを分離酵母細胞に試験することが必要である。実験酵母ではベクター DNA に、使用する受容菌株の栄養要求性を補足する遺伝子を組込むことによりこれが達成できる。動原体であり、栄養要求性を示さない酵母酵母を形質転換するためには、後述選択遺伝子に基づく選択系を利用する必要がある。この点から、複数 2  $\mu$ m プラスミドベクターは次のようないくつかの物質に対する耐性を仲介する遺伝子を保有することが報告されている。

夫が酵母固有の 2  $\mu$ m プラスミドからの DNA の SacBII 部位および XbaI 部位に開まれた 70 の塩基対より成る特許請求の範囲第10)項記載の 2  $\mu$ m プラスミドベクター。

### 3. 発明の詳細な説明

本発明は酵母酵母の遺伝子操作に関する。

組換え DNA を形質転換法によつて酵母実験室に導入することはよく行なわれており、1970 年代後期に始めてこの現象が報告されて以来 (Risinen ら, 1978 年; Beggs, 1978 年) 高度に、かなり進歩してきた。酵母の形質転換に通常使用されるベクターは二つのタイプに分類される。

(i) 複製ベクター、即ち、DNA 複製の機能的開始点が存在するため、酵母の染色体 DNA とは独立に自己維持を仲介できるベクター、および

(ii) 複製のため、またさらに宿主中の組換え DNA の維持のために染色体 DNA との組換えを必要とする組込みベクターである。複製ベクターはさらに次のようく分類できる。

(a) 抗生物質、例えば G-418 (Jiminez ら, 1980 年; Webster ら, 1983 年)、ハイドロキシマシン (Orton ら, 1983 年)、クロラムフェニコール (Cohen ら, 1980 年)、および

(b) 糖類物質、例えば、酵母用カルボメチルシメチル (酵母のアセト乳酸合成酵素遺伝子 ILV-2 の変異により耐性) (Falcon ら, 1985 年) および糖 (酵母の CUP-1 遺伝子を介して耐性) (Henderson ら, 1985 年)。

複製型プラスミドで酵母を形質転換すると全ての場合、形質転換表現型の安定性は細胞増殖の非選択条件下で低い。即ち、2  $\mu$ m 複ベクターは通常なしで一回の分裂につきおよそ 1~5 パーセントの頻度で受容酵母実験室株から消失していく (Beggs, 1978 年; Braach ら, 1977 年; Gerbaud ら, 1979 年; Suzuki ら, 1979 年)。

このようなプラスミドの酵母に發行る相対的安定性は酵母宿主に依る。この点で、酵母株を保有

する 2  $\mu$ m プラスミドは、酵母で一回の分裂につきおよそ 0.1 % の頻度で失なわれることがわかつている ( Hinchliffe および Daubney , 1986 年)。受容酵母がプラスミドの安定性に影響するのと同じように、プラスミド自身の性質も重要な役割を有する。例えば、ARS プラスミドは細胞分裂当たり 1.0 倍以上の頻度で失なわれる ( Kikuchi , 1985 年)。細胞の連続増殖後も形質転換表現型を安定に維持するためにはプラスミドの選択を維持する必要がある。実験室酵母形質転換株の場合には受容酵母株が要求する栄養素を欠損する最少培地で通常選択する必要があるため細胞増殖に用いる培地の性状に制限がかかる。しかし、酵母酵母の場合通常の生育培地であるホップ入りビール麦芽汁に抗生素質、或いは銀のような毒性物質を添加することは、それらが高錆でありまた器質の主要産物であるビールの質に悪い影響を及ぼすため、実用的でなくまた望ましくない。

#### 非選択生育条件下で酵母における組換え遺伝子

Biotechnics International Inc. )。この系は酵母酵母での遺伝子安定性を与えるが、組換え DNA の高コピーアー維持はせず、酵母酵母の本質的な低形質転換効率のため実施するのにより困難である。

本発明は酵母、特に酵母酵母の 2  $\mu$ m 型組換えプラスミドによる形質転換の方法を提供する。酵母酵母の形質転換はプラスミド上に酵母の CUP-1 遺伝子が存在することにより耐性の転換株を選択できることで行なう事が可能であるが、抗生素質耐性を含むどんな優性選択マーカーをも使用することができ、実際に目的のペグチド産物をコードする遺伝子とは異なる別のマークー遺伝子を使用することができる。組換えの「目的遺伝子」を安定に維持するためには遺伝子を酵母酵母の内生 2  $\mu$ m プラスミド内の部位に遺伝組換えにより組込むことを行なう。本プラスミドは今まで調べられた限り全ての所有酵母菌株に存在する ( Hinchliffe および Daubney , 1986 年)。内因性 2  $\mu$ m プラスミドの普遍的存在はこのプラ

の維持を確保する一つの方法としては受容体に導入された時ベクターと染色体 DNA の相同配列での遺伝子組換えによる宿主染色体への組込みを避ける組込み酵母ベクターの使用がある。しかし、そのようなベクターは極端に低い形質転換効率を有し、 $\mu$ g の DNA 当り約 1 ~ 1.0 倍の転換株しか得られない ( Hinne ら , 1978 年 ; Hicks ら , 1979 年)。この頻度は形質転換する DNA を DNA 相同性領域で切断するような制限エンダヌクレアーゼで切断することにより高い組換え分子を形成して高めることが出来る ( Hicks ら , 1979 年)。この現象は、組込みベクターによる形質転換効率を制限する主要因子が DNA 組込みではなく、むしろ組換えにあることを示唆している。この事は、組換えのための目的 DNA 配列が宿主細胞の代謝に影響を与えない領域にさえあれば組込みベクター系の酵母酵母への応用を制限しない。上述の原理に基づき、組込み酵母ベクターが酵母酵母に応用されている ( 酵母ベクター、ヨーロッパ特許公報 No 1 63,493 )。

プラスミドが酵母酵母中で見かけ上非選択生育下で多くの世代を経ても安定に維持されることを示す。実って理想的には、目的遺伝子の組込みを 2  $\mu$ m プラスミド中の内生 2  $\mu$ m プラスミドの遺伝的安定性に悪影響を及ぼさない部位に行なう事が必要である。

酵母の 2  $\mu$ m プラスミドは 6.5 ~ 8 塩基対の環状 DNA 分子で、全ヌクレオチド配列が決定されている ( Barstley および Donelson , 1980 年)。本プラスミドは酵母酵母 ( Alal ら , 1984 年 ; Hinchliffe および Daubney , 1986 年 ) を含む *Saccharomyces cerevisiae* のほとんどの菌株 ( Clarke-Walkers および Miklos , 1974 年 ) に細胞当たりおよそ 5.0 ~ 1.0 G コピー存在する。本プラスミドは非メンデル様式で遺伝し ( Livingstone , 1977 年 )、そのため細胞中で細胞質性と考えられている。しかし、本プラスミドが核内に存在することを示す多くの重要なデータもある ( Nelson および Fangman , 1979 年 ; Livingstone および Rahne , 1979 年 ; Seligy

ら、1980年; Takano S., 1980年; Sigurdssonら、1981年)。本プラスミドの重要な特徴としては、二つの逆転したくくり遺伝子(長さが5-99塩基対)が存在し、このため分子が二つの特有な領域に分離されていることである。逆くくり遺伝子での分子内組換えの結果、一方の特有領域が他方に対して逆置し、生体内で $\alpha$ および $\beta$ と呼ばれる二つのプラスミド構造体の混合を形成する(Boegs, 1978年)。二つの逆くくり遺伝子は、プラスミド自体に存在するFLPと呼ばれる遺伝子の産物により仲介される。FLP遺伝子は逆くくり遺伝子の領域での真横遺伝子を仲介できる蛋白質をコードする。

従くことれ、「目的の遺伝子」が内生2 $\mu$ mプラスミドの遺伝的安定性に悪影響を及ぼすことなく2 $\mu$ mプラスミド内に組込まれることを見つめた。

本発明によると、目的の蛋白質またはペプチドをコードするDNA配列を酵母固有の2 $\mu$ mプラスミド内に組込むことによる酵母の遺伝的修飾方法

でのプラスミドの複製を妨げるDNA配列、およびプラスの複製を助ける該DNA配列から直列方向の該相同配列で隔てられた目的の真横蛋白質またはペプチドをコードするDNA配列とから成る2 $\mu$ mプラスミド組込みベクターを提供する。

本発明の方法では、組込みは組換えを通して起り、ベクターの相同DNAくくり遺伝子配列の間に残されていない残りのベクターDNAを除外して組換え遺伝子(目的のDNA配列)の組込みを行なう。本方法では、「目的の遺伝子」のみが酵母、例えば酵造酵母、中で非遺伝子条件下において何世代も安定に維持され、それにより余分なDNA配列で組り得る酵母の技術上の性状或いは酵母により産業される生成物であるビールの風味および品質に対する悪影響を回避できる。

本発明はこの理論の真実性に依存してはいないが、本ベクターは酵母に導入されると相同DNAくくり遺伝子配列の間の分子内組換えが起り、それだけ内生2 $\mu$ mプラスミドに相同な一つのDNA配列を有する二つのプラスミド断片を生成すると考え

は、先ず相同な2 $\mu$ mプラスミドDNA配列が相互に直列方向に位置する2コビーオおよび該DNA配列を有する組込みベクターで酵母を形質転換し、次に得られる組換え株より、ベクターは含まないが目的のDNA配列を組込んだ内生2 $\mu$ mプラスミドを有する細胞を増殖することから成る。目的のDNA配列は組込みベクター内に該配列を挿入できる例えばBamHI部位またはKpnI部位などの適当な制限酵素部位を介して組込まれる。ベクターは通常、無関係なDNA配列、即ち、酵母中でのプラスミドの複製に必要でなく、好ましくもないが、バクテリアまたは他の酵母以外の微生物での複製のために好ましい配列を有する。このようなDNA配列は目的の蛋白質またはペプチドをコードするDNA配列から直列方向の相同配列により隔てられる。好ましくはこの配列は酵母に対して外來性であつてバクテリア中でのベクターの複製を妨げる配列である。

本発明はさらに、直列方向に相同的な2コビーオの2 $\mu$ mDNA配列、通常は酵母に外來性で酵母以外

られている。これらの断片の一つが元のベクターが保有していた2 $\mu$ mの複製開始点を有し、もう一方は最初ベクターのくくり遺伝子配列の間に存在した他のDNA配列を保有する。後者のプラスミド断片が酵母の内因性2 $\mu$ mプラスミドと相同領域で組換えを起こし、酵母内生2 $\mu$ mプラスミドと元のベクターの直列方向の二つの相同DNAくくり遺伝子配列の間に含まれていた目的のDNA配列を相同領域に挿入されて保有する安定な組込み体を生成する。

実際には「目的の遺伝子」は酵母にとり何種または多くの場合異種のいかなる組換え遺伝子でもよい。例えば、本法はヒト血清アルブミン遺伝子を酵造酵母に安定に組込むために利用され、その結果、例えばホスファグリセリン酸キナーゼプロモーター(PGK)のような酵母構成プロモーター、或いは例えばヨーロッパ等許出願No.66303039.1、No.20112359として公開の「Fermentation with an Inducible Gene Expression System」(Delta Biotechnology Ltd.)に記載される

GAL 1.0 / CYC 1 総種プロモーターあるいは英國特許出願 No 8 6 2 0 9 2 6 ( 1986 年 8 月 2 6 日由来の「 Yeast Promoter 」 ( Delta Biotechnology Ltd. ) に記載の GAL 1.0 / POK プロモーター ( PAL ) のような酵母調節プロモーターから該遺伝子が発現される。

本システムにより安定に組込むことの出来る他の遺伝子としては、酵造酵母で菌体外にグルコアミラーゼ酵素を生産する *Saccharomyces*

*diastaticus* の Dex-1 遺伝子および酵造酵母でエンド-1,3-1,4- $\beta$ -ダクタナーゼの生産を指示する *Bacillus subtilis* の  $\alpha$ -ダルカナーゼ遺伝子 ( Hincliff らおよび Box , 1985 年 ) がある。異種遺伝子は必ず遺伝子修飾して遺伝子発現レベルを調節し、または遺伝子により生産が仲介される蛋白質が酵造酵母により菌体外に分泌されるようとする。

本発明の遺伝子組込み方法では、目的の遺伝子が高コピーレベルで非選択生育条件下で安定に維持される。これは特にヨーロッパ特許出願

No 8 6 3 0 3 0 3 9.1 ( Fermentation with an Inducible Gene Expression System ) に記載される方法を実施する際に有利である。それはこれらの条件下で目的遺伝子の発現は制御され、主要ビール発酵の工程中では発現されないが発酵後に誘導されるからである。目的遺伝子の高コピーレベルを確保することにより発酵後に高レベルの誘導を達成することが可能で、従つて生産する異種蛋白質の量を増加できる。

*Saccharomyces diastaticus* Dex-1 遺伝子を安定に組込むことにより、菌体外グルコアミラーゼが特に荐在する麥芽汁中でのん粉 ( ダキストリ ) を加水分解するためにビールの生産を高める。従つて、このシステムを用いることによつて高価な市販の酵素を添加することなく、非発酵性のん粉の一部を発酵性の糖に、そしてアルコールに変換してビールを生産することが可能である。

#### ＜実施例 1 ＞

##### 酵母 CUP-1 遺伝子の酵造酵母菌有 2 μm プラスミドへの組込み

プラスミド pMB1.1 ( ヨーロッパ特許出願 No 8 6 3 0 3 0 3 9.1 , 企開 No 2 0 1 2 3 9 , Fermentation with an Inducible Gene Expression System ; Delta Biotechnology Ltd. ) に記載 ) をビール酵母菌株 NCYC 2 4 0 ( エール酵母 - National Collection of Yeast Cultures , 英国ノリッジ , ゴルニーレーン ) よび NCYC 1.0 , 2 ( ラガー酵母 - Bass Yeast の所有菌株 ) に形質転換し、 Hincliff らおよび Deubney ( 1986 年 ) に記載されるように網織性試験を選択する。 NCYC 2 4 0 ( pMB1.1 ) は 1984 年 1 月 1 2 日に英國ノリッジ NR4, 7 人り、ゴルニーレーンの National Collection of Yeast Cultures ( NCYC 1.5 4 7 ) として登録されている。

形質転換株は網織性 ( > 1 mM CuSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O ) ,  $\beta$ -ガラクトシダーゼ陽性 ( M - 6.3 , 2 % / バガラクトースおよび X-gal 上で青 / 緑色 , ヨーロッパ特許出願 No 8 6 3 0 3 0 3 9.1 ) よりび  $\beta$ -ラクタマーゼ陽性を確認する。形質転換株を 2

2 % / バガラクトースおよび 0.2 mM CuSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O を添加した NEP 培地中で後期延長期まで生育させてから非選択培地 ( NEP , 2 % / バガラクトース加で CuSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O を含有せず ) に移す。およそ 1.5 - 2.0 回の細胞分裂の後酵母細胞を収集して NEP , 2 % / バガラクトース寒天培地に單ロード一分離のためまく。各ロードにつき 0.2 mM CuSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O および 1 mM CuSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O を添加した同培地にレプリカしてプラスミド pMB1.1 の存在を、また 2.0 % / バガラクトースおよび X-gal を添加した M - 6.3 培地にレプリカして表現型を確認する。

その結果、プラスミド pMB1.1 はいずれのビール酵母に於いても不安定であり、ロードの多くが網織性  $\beta$ -ガラクトシダーゼ陰性 ( ヨーロッパ特許出願 No 8 6 3 0 3 0 3 9.1 ) および  $\beta$ -ラクタマーゼ陰性を確認する。この不安定性は非選択的に生育させた酵造酵母中での 2 μm プラスミドとして予想されるものである。しかし、網織性  $\beta$ -ガラクトシダーゼ陰性ロード ( pMB1.1 ライオヌ ) よりび網織性  $\beta$ -ガラクトシダーゼ陽性ロード ( pMB1.1 プラ

ス)の他に、0.2 mM  $\text{CaSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  の耐性を示すがターガラクトンダーゼを生産しないヨロニーも少し得られた。この後後のタイプのヨロニーを単離し、さらに調べた。遺伝解析の結果、これらのヨロニーはターガラクトンダーゼもターラクターマーゼも生産することが出来なかつた。

耐耐性ターガラクトンダーゼ陰性の細胞を分子生物学的分析にかけた。酵母全DNAをCryerら(1975年)の方法により分離し、制限エンドヌクレアーゼ  $\text{Bgl I}$  および  $\text{Cla I}$  で消化した。消化および未消化DNA断片をアガロースゲル電気泳動により分離して Southern の方法 (Vassilatis ら, 1982年)によりエトロセムロースフィルターに移す。フィルターを前ハイブリダイゼーション後洗浄(5 mMのサケ精子DNA、10 mMのクン虫精アルブミン、10 mMのアラゴル、10 mMのボリビニルゼロリドン、0.1 Mのグリシンを含有する10 mMの5.0 mM  $\text{MgCl}_2$  ミクセル: 100 mMウリ酸後洗浄: 6.5を5倍の  $\text{SSC}$  (0.15 M  $\text{NaCl}$ 、0.015 M  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_2\text{O}_4$  )、

ことが確認され、これは2  $\mu\text{m}$  (6.5キロベース対)とpERB11に存在する相同2  $\mu\text{m}$  DNAのくり返えしの間に含有されるCUP-1配列の組成物である。

さらに金染色体DNAをE. coli  $\text{O}142$  遺伝子および余分のE. coliプラスミドDNAを保有する $^{32}\text{P}$ 標識プラスミド pMC1403DNA (Casasnovas ら, 1980年)とハイブリダイゼーションした結果は、耐耐性ターガラクトンダーゼ陰性ターゲットはpERB11が保有する実質的に全てのバクテリアDNA配列を欠損していることを示した。

CUP-1遺伝子の酵母2  $\mu\text{m}$  プラスミド中の組込み部位はpERB11の直列方向DNAくり返えし配列が保有するDNA相同領域内であることがわかつた。これは金DNA制限酵素消化物をプラスミド pJDB110 (Beagles, 1981年)に由来する2158塩基対の $^{32}\text{P}$ 標識  $\text{Bam I}$  -  $\text{Rba I}$  断片でハイブリダイズして決定された。この2158塩基対断片は2  $\mu\text{m}$  2組のDNA複数開始点とヨロニーの遺伝くり返えしDNA配列とを含有する。従つ

7.0.3)中、42°Cで1~2時間前ハイブリダイゼーションを行なつた後、P32-でニクト酸銀DNAプローブを用いてDNA : DNAハイブリダイゼーションを行なう (Rigby ら, 1977年)。DNA相同領域をオートラジオグラフィーで判定する。CUP-1遺伝子 (Henderson ら, 1985)を含有するpET13-1の1.25キロベース対の  $\text{Sau 3A}$  断片とのハイブリダイゼーションの結果、耐耐性ターガラクトンダーゼ陰性ターゲットはプラスミド pERB11を保有するビール酵母形質転換株で観察されるパターンと異なるハイブリダイゼーションパターンを示した。得られたハイブリダイゼーションパターンはpERB11のCUP-1配列がビール酵母菌株の含有2  $\mu\text{m}$  プラスミドに組込まれていることを示唆していた。さらに、未消化DNAとのハイブリダイゼーションの結果、耐耐性ターガラクトンダーゼ陰性ターゲットは、プラスミド pERB11がおよそ1.2.5キロベース対の大さきを有するのに対し、CUP-1遺伝子を含むおよそ2.15キロベース対の小プラスミドを保有する

てCUP-1遺伝子が遺伝くり返えしの一方にすぐ隣接したDNA領域に組込まれると、サザンハイブリダイゼーション後に見られる通常の制限パターンに違がが生じる。サザントランスマニアおよびハイブリダイゼーションとさせた標準の制限酵作用法により、挿入部位が2  $\mu\text{m}$  2組の座標の  $\text{Bam I}$  部位と座標713の  $\text{Xba I}$  部位に組まれる703塩基対のDNA領域内に位置することがわかつた (Broach, 1981年)。

#### 組込みCUP-1遺伝子の安定な高ヨード濃度特

ビール酵母の耐耐性ターガラクトンダーゼ陰性ターゲット、以後「組込み体」と呼ぶ、の耐耐性表現型の遺伝的安定性を非選択条件下で生育させた後分析した。

組込み体を単離し、2 %/タガロースおよび0.2 mM  $\text{CaSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  を含有する1.0 MのNEP中で定期期まで増殖させる。遠心分離により酵母菌体を集め、低酸素を含有しない新しい培地に移す。酵母を中期対数増殖期まで生育させ、新しい生育開始に移す。CUP-1遺伝子の存在はNEP、2 %

2% ダルコース寒天培地にプレートした後 0.5 μm CuSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O を添加した同じ培地にレプリカすることにより追跡した。このような非選択条件下での連続培養をおよそ 100~130 世代続ける。第 2 図に示す結果は耐耐性の表現型はこの期間中安定であることを示している。2 μm 組換えプラスミド pET 13:1 で形質転換したビール酵母を用いて同じ実験を行なうと、かなりの程度の遺伝的不安定性が見られた(第 2 図)。さらに、通常に標識した DNA プローブ(上述)での DNA ハイブリダイゼーションによる組込み体の分子解剖結果は、非選択条件下での連続的生育の後も CUP-1 遺伝子が内生 2 μm プラスミド中に維持されていることを示した。

酵造酵母は通常一コピの CUP-1 遺伝子を染色体上に 5.2 キロベース対 Eco RI 断片内に保有している。従つて組込み体ビール酵母中の CUP-1 遺伝子の染色体外コピ数を、全酵母 DNA の Eco RI 消化物を <sup>32</sup>P 標識 CUP-1 プローブ (pET 13:1 からの 1.25 キロベース対の Sau

#### pETB 11 の一級 2 μm 組込みベクターとしての利用

プラスミド pETB 11 は直列方向の 703 塩基対の相同くくり還元内に CUP-1 遺伝子の 3' 末端に接続して(第 1 図)特徴的な Kpn I 割限エンドヌクレオアーゼ部位を有する。この独特な部位はさらに新たな DNA 配列、例えば「目的の遺伝子」を挿入するのに都合良く、その結果うまく形質転換するビール酵母の内生 2 μm プラスミド中に組込むことが出来る。プラスミド pETB 11 およびその独特な Kpn I クローニング部位を利用することにより、調節型 GAL 1.0 / CYC 1 プロモーター-タミネーター発現カセットにより発現されるヒト血清アルブミン (HSA) 遺伝子を選択的に組込むことが可能であり、その結果、調節された HSA 発現カセットを高コピ数で安定に維持できる。これによりこの組込み遺伝子を保有するビール酵母が既に記載されている方法(ヨーロッパ特許出願 No. 86303039.1)に従つて発酵工程後に HSA 生産を誘導されると高レベルの遺伝子発現が

される断片 (Hedderson ら, 1985 年) でプローブングすることにより検定することが出来る。このようなハイブリダイゼーションの結果、5.2 キロベース対の染色体 CUP-1 断片および内生 2 μm プラスミドに組込まれた CUP-1 遺伝子に由来する 3.0 キロベース対断片に相当する二本の DNA 相同バンドが得られた。

二つのバンドを露光したオートラジオグラムのデジタルシグマータースキャナによる強度の比較で染色体遺伝子数に対比した染色体外 CUP-1 遺伝子のおよそのコピ数を見積ることが出来る。このようにして、組込み体が CUP-1 染色体遺伝子通りおよそ 87 コピーの染色体外 CUP-1 遺伝子を保有することが推定された。

酵母の再くり返えし 53 リボルム DNA (Pates ら, 1985 年) に対する CUP-1 遺伝子の相対的強度比較によるという他の方法での染色体外 CUP-1 遺伝子のコピ数測定の結果組込み体では一倍体遺伝子通り 53 のコピ数が得られた。

總る。

#### 引用文献

Aigle *et al.*, (1984), *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 42, 1.

Beggs, (1978), *Nature*, 275, 104.

Beggs (1981), In: "Molecular Genetics in Yeast" Alfred Benzon Symposium No. 16, Munksgaard, Copenhagen.

Breach (1981), In: "The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces: Life Cycle and Inheritance", Eds. Strathern *et al.* Cold Spring Harbor, N.Y., pp 445.

Breach & Hicks, (1980), *Caii*, 21, 501.

Casadaban *et al.*, (1980), *Journal of Bacteriology*, 143, 971.

Chevallier & Aigle, (1979), *FEBS Letters*, 108, 179.

Clark-Walker & Miklos, (1974), *European*

Journal of Biochemistry, 41, 369.

Cohen et al., (1980), Proceeding of the National Academy of Sciences, USA, 77, 1078.

Cryer et al., (1975), In: "Methods in Cell Biology", 12, Academic Press, pp. 39-44.

Falco et al., (1985), Nucleic Acids Research, 13, 4011.

Gerbaud et al., (1979), Gene, 5, 233.

Gritz et al., (1983), Gene, 25, 179.

Hartley & Donaisen, (1980), Nature, 286, 860.

Henderson et al., (1985), Current Genetics, 9, 183.

Hicks et al., (1979), Cold Spring Harbour Symposium Quantitative Biology, 43, 1305.

Hinchliffe & Box (1985), Proceeding of the European Brewery Convention Congress, 20th, Helsinki, 267.

Hinchliffe & Daubney (1986), Journal of the American Society of Brewing Chemists, 44,

98.

Winzen et al., (1978), Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 75, 1929.

Simone et al., (1980), Nature, 287, 869.

Kikuchi, (1983), Cell, 35, 487.

Livingston, (1977), Genetics, 86, 73.

Livingston & Hahne, (1979), Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 76, 3727.

Maniatis et al., (1982), In: "Molecular Cloning a Laboratory Manual", Cold Spring Harbour.

Nealon & Fangman, (1979), Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 76, 6815.

Perez et al., (1978), Journal of Bacteriology, 134, 295.

Rigby et al., (1977), Journal of Molecular Biology, 113, 237.

Seligy et al., (1980), Nucleic Acids Research, 8, 8371.

Sigurdson et al., (1981), Molecular and General Genetics, 183, 59.

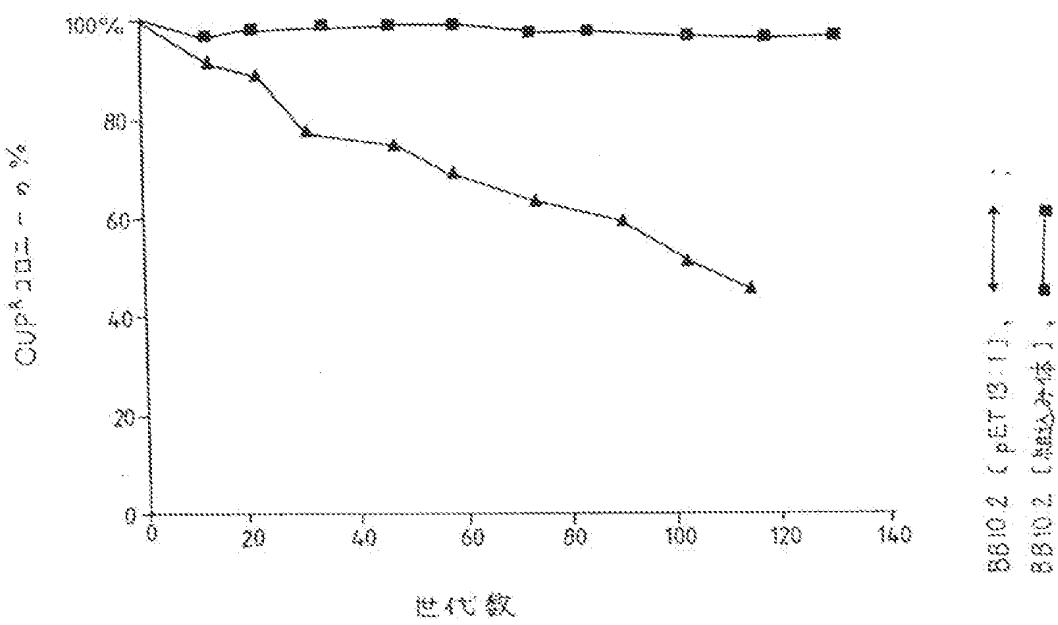
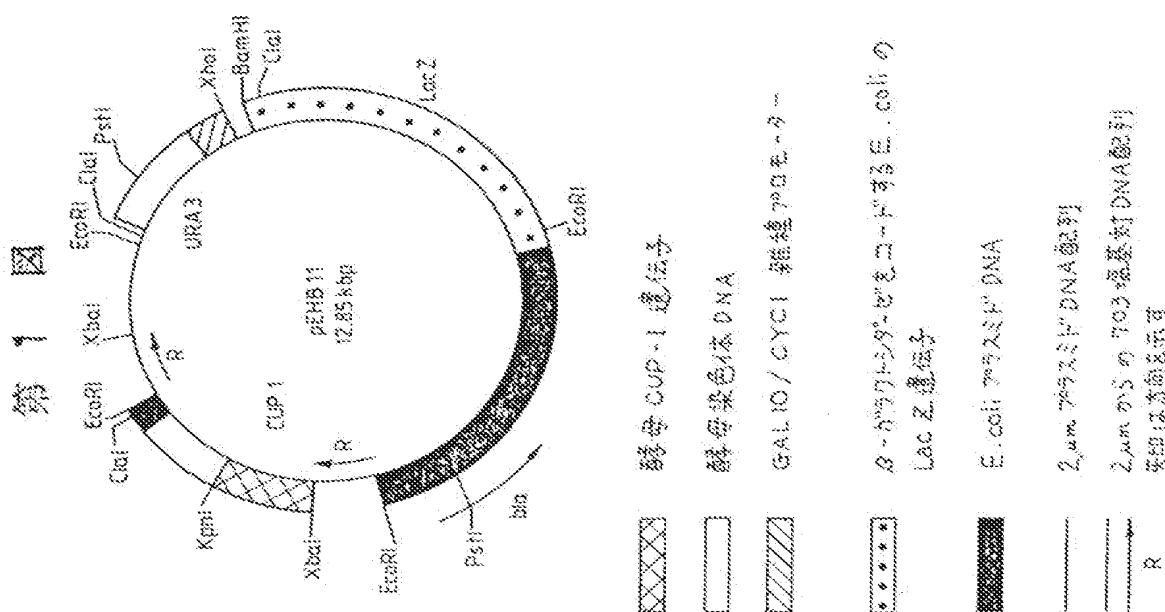
Struhl et al., (1979), Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 76, 1055.

Taketa et al., (1980), Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 77, 3144.

Webster et al., (1983), Gene, 26, 245.

## 4. 図面の簡単な説明

第1図はpHERB 1.1の構成を示す模式図であり、第2図はラグー酵母菌株 BB 1.0.2におけるCUP-1の安定性を示すグラフである(ラグー酵母菌株 BB 1.0.2の表現型の安定性: BB 1.0.2 ( pET 1.3 : 1 ), ← ; BB 1.0.2 ( 細胞内体 ), → )。



第2図

## 手 続 類 正 書 (略)

昭62年7月3日

## 特許庁長官致

## 1. 事件の表示

昭62特許第159504号

## 2. 発明の名称

液体の濃縮子供飲料

## 3. 納正をする者

申請との同意 特許出願人

氏名

タルタ バイオテクノロジー リミテッド

## 4. 代理人

氏名 平100 東京都千代田区大手町二丁目2番1号

都 大手町ビルディング331

電話 (210) 3-6383 (代)

氏名 (8662) 浅村

## 5. 納正命令の日付

昭62年8月8日

## 6. 納正により増加する発明の数

## 7. 納正の対象

特許第



## 8. 納正の内容 別紙のとおり

明細書の添付 (内容に変更なし)

